 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.06.22 J South Med Univ, 2015, 35(6): 888-893

临床研究

MASP2在小儿上呼吸道感染中的意义

熊思敏[1],赵 娜[1],裘宇容[2],张丽芸[1],左大明[1],陈政良[1]
南方医科大学[1]基础医学院免疫学教研室,[2]南方医院检验科,广东 广州 510515

摘要:目的 探讨血浆甘露聚糖结合凝集素(MBL)相关丝氨酸蛋白酶2(MASP2)水平在儿童上呼吸道感染(上感)中的意义。**方法** 取103例上感患儿和35例健康体检儿童作为研究对象,测定其血浆MASP2和C反应蛋白(CRP)浓度并进行白细胞计数(WBC)。根据CRP和WBC值、感染不同时期及有无治疗,上感儿童分为CRP升高组(n=48)与正常组(n=54)、WBC升高组(n=61)与正常组(n=40)、感染早期未用药组(n=68)与感染中后期已用药组(n=35),对各组资料进行统计学分析。**结果** 上感组MASP2浓度显著高于对照组(P<0.001),CRP升高组血浆MASP2浓度与CRP值正相关(r=0.310,P<0.05),WBC升高组MASP2水平与WBC值显著正相关(r=0.392,P<0.01),感染早期未用药组MASP2浓度显著高于感染中后期已用药组(P<0.01),*MASP2*、*CRP*、*MBL2*基因具有共同的转录因子HNF-4α结合位点。**结论** MASP2蛋白可能为急性期蛋白,血浆MASP2水平可作为辅助诊断小儿上感的一个参考指标。
关键词:甘露聚糖结合凝集素相关丝氨酸蛋白酶2;上呼吸道感染;C反应蛋白;白细胞计数

Plasma levels of mannan-binding lectin-associated serine protease 2 in children with upper respiratory tract infection

XIONG Simin[1], ZHAO Na[1], QIU Yurong[2], ZHANG Liyun[1], ZUO Daming[1], CHEN Zhengliang[1]
[1]Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, [2]Clinical Laboratory Center, Nanfang Hospital, *Southern Medical University, Guangzhou 510515, China*

Absteact: Objective To explore the significance of plasma levels of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 (MASP2) in children with upper respiratory tract infection (URTI). **Methods** A total of 103 children with URTI and 35 healthy children were examined for plasma levels of MASP2 and C-reactive protein (CRP). According to CRP levels, white blood cell count (WBC), stage of infection, and administration of treatments, the children with URTI were divided into the elevated CRP group (n=48) and the normal CRP group (n=54), elevated WBC group (n=61) and normal WBC group (n=40), the early stage of infection without treatment group (n=68) and mid-late stage of infection with treatment group (n=35). **Results** Plasma MASP2 levels was significantly higher in URTI group than in the healthy control group (P<0.001) and showed a close correlation with age (r=0.302, P<0.01). Plasma MASP2 level was significantly correlated with CRP level in elevated CRP group (r=0.310, P<0.05) but not in normal CRP group (P>0.05), correlated with WBC in elevated WBC group (r=0.392, P<0.01) but not in normal WBC group (P>0.05), and was significantly higher in early stage infection without treatment group than in mid-late stage of infection with treatment group (P<0.01). MASP2, MBL2 and CRP genes had a common binding site for the transcription factor HNF-4α.
Conclusion MASP2 may be an acute-phase protein, and its plasma level might serve as a new reference index in the diagnosis of URTI in children.
Key words: mannan-binding lectin-associated serine protease 2; upper respiratory tract infection; C reactive protein; white blood cell count

上呼吸道感染(上感)是儿童最普遍的感染性疾病,是5岁以下儿童病死的首位原因,严重影响小儿的身体健康及发育。甘露聚糖结合凝集素(mannan binding lectin, MBL)缺损是导致儿童反复上呼吸道感染感染的主要因素之一[1-2]。MBL识别病原体后,以Ca^{2+}依赖方式激活MBL相关丝氨酸蛋白酶(MBL-associated serine proteaes, MASP1和MASP2)而进一步激活补体凝集素途径,发挥溶破和调理吞噬功能[3]。MASP2主要由肝脏合成分泌,是激活凝集素途径的关键蛋白酶,而凝集素途径还可由几种胶原纤维素(ficolins)活化,故认为MASP2在凝集素途径中的作用更甚于MBL。研究表明,血清MASP2浓度与感染性疾病密切相关,MASP2水平降低使得白血病患者在接受化疗后更易感染,是易于导致白血病患者高频率发热的一个因素[4]。目前,尚未见血浆MASP2浓度与上感关系的报道。故

收稿日期:2015-02-07
基金项目:广州市科技计划项目(2009J1-C481)
作者简介:熊思敏,在读研究生,E-mail: xsm200890@126.com
通信作者:陈政良,博士,教授,博士生导师,电话:020-61648477,E-mail: zhlchen@smu.edu.cn

而设计本实验,意欲了解血浆MASP2水平与上感易感性的关系,然而却发现上感儿童血浆MASP2水平高于正常对照儿童,这一结果与预期相悖。因此,我们试图从MASP2水平与上感有关临床指标的关系等方面来探讨其可能意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取2014年10月~12月在南方医院儿科门诊接受治疗的103例上感患儿作为研究对象,其中男53例,女55例,年龄0~13岁,平均年龄3.1岁。所有患者均符合第七版《儿科学》中的诊断标准[5],无其他慢性疾病。根据上感组CRP水平分为CRP升高组(CRP>5 mg/L)和CRP正常组(CRP≤5 mg/L);根据上感组WBC水平分为WBC升高组(WBC>9.5×10⁹ G/L)和WBC正常组(≤9.5×10⁹ G/L,>3.5×10⁹ G/L);根据是否用药分为感染早期(出现症状后1~3 d内)未用药组及感染中后期已用药(主要是抗病毒药利韦巴林和抗细菌药头孢类抗生素)组。另选取对照组35例,为同期健康体检的正常儿童,年龄0~13岁,平均年龄4.7岁。

1.2 仪器与试剂

主要仪器:多功能标记分析仪(PerkinElmergo,美国)、恒温水浴锅(金坛市医疗仪器产,中国江苏)、离心机(Eppendorf,德国)、Cobas 501全自动生化分析仪(Roche,德国)、HST302血细胞分析流水线XE-2100血液分析仪(Sysmex,日本)。主要试剂:MASP2检测试剂盒(USCN,中国武汉)、CRP检测试剂盒(Roche,德国)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及处理 取静脉血1 mL,抗凝;静置10 min,3000 r/min离心10 min,留取上清液;置-70 ℃冰箱保存,供测定MASP2浓度用。

1.3.2 CRP及WBC定量测定 CRP严格按照试剂盒说明书操作,采用颗粒增强透射免疫比浊法测定。WBC采用流式细胞计数法测定。

1.3.3 MASP2浓度测定 按试剂盒说明书操作,简述如下:吸取稀释血浆(1∶100)和8个不同浓度的标准品液各100 μL,加于各对应孔中,37 ℃水浴2 h;弃去液体并甩干后,每孔加入生物素化的MASP2抗体溶液100 μL,37 ℃水浴1 h;洗涤液洗涤,1.5 min×3次;每孔加入HRP标记的亲和素溶液100 μL,37 ℃水浴0.5 h,洗涤5次;每孔加入底物溶液90 μL,37 ℃避光显色15 min后,每孔加入终止液50 μL终止反应。在多功能标记分析仪上测定各孔$A_{450\ nm}$值,根据标准曲线得到各样本MASP2浓度值。

1.4.4 统计学分析 所有数据应用EXCEL建立数据库,采用SPSS16.0统计软件对数据进行分析处理,计量资料组间比较以非方差齐性两样本独立*t*检验及Spearman相关分析,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

1.4.5 生物信息学分析 应用生物信息学分析MASP2基因与急性期蛋白MBL、CRP基因是否存在共同的应激元件。DNA序列比对网站为NCBI/ BLAST(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) UCSC (http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway), microRNA数据库网站是CHIPBase (http://deepbase.sysu.edu.cn/chipbase/),转录因子结合谱数据库为JASPAR(http://jaspar.binf.ku.dk/)。

2 结果

2.1 上感组血浆MASP2浓度高于对照组

103例上感患者血浆样本与35例健康儿童血浆样本经ELISA试剂盒检测,得到MASP2浓度值。上感组与对照组血浆MASP2水平有非常显著差异($t=11.126$, $P<0.001$)。上感组血浆MASP2浓度区间为[159,640],平均浓度为316 ng/mL;健康对照组浓度区间为[33,304],平均浓度130 ng/mL(图1)。

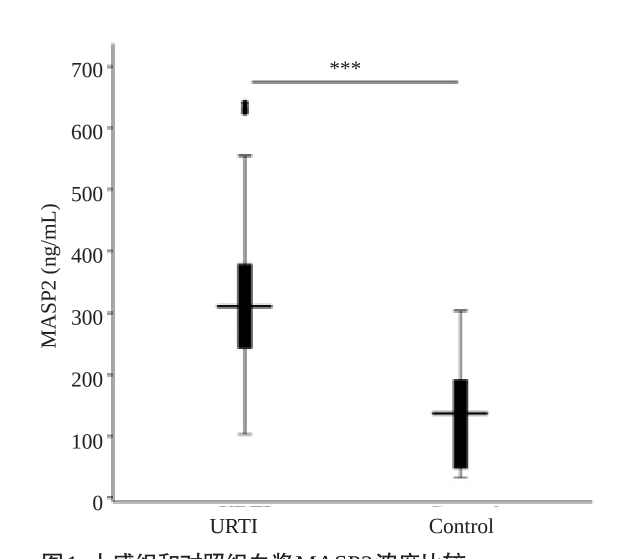


图1 上感组和对照组血浆MASP2浓度比较

Fig.1 Comparison of plasma MASP2 concentrations between URTI group and normal control group, ***$P<0.001$.

2.2 上感儿童MASP2浓度与年龄正相关

对103例上感患者血浆MASP2浓度与年龄做Spearman相关分析,得出上感组血浆MASP2浓度与年龄成显著正相关($r=0.302$, $P<0.01$)。将103例患者按照性别分为男、女2组,进行两样本的独立*t*检验,发现男性组血浆MASP2略高于女性组,但2组之间血浆MASP2水平无统计学差异($P>0.05$,图2)。

2.3 上感儿童CRP升高组血浆MASP2浓度与CRP值正相关但CRP正常组MASP2浓度与CRP值不相关

上感儿童CRP正常组与CRP升高组血浆MASP2

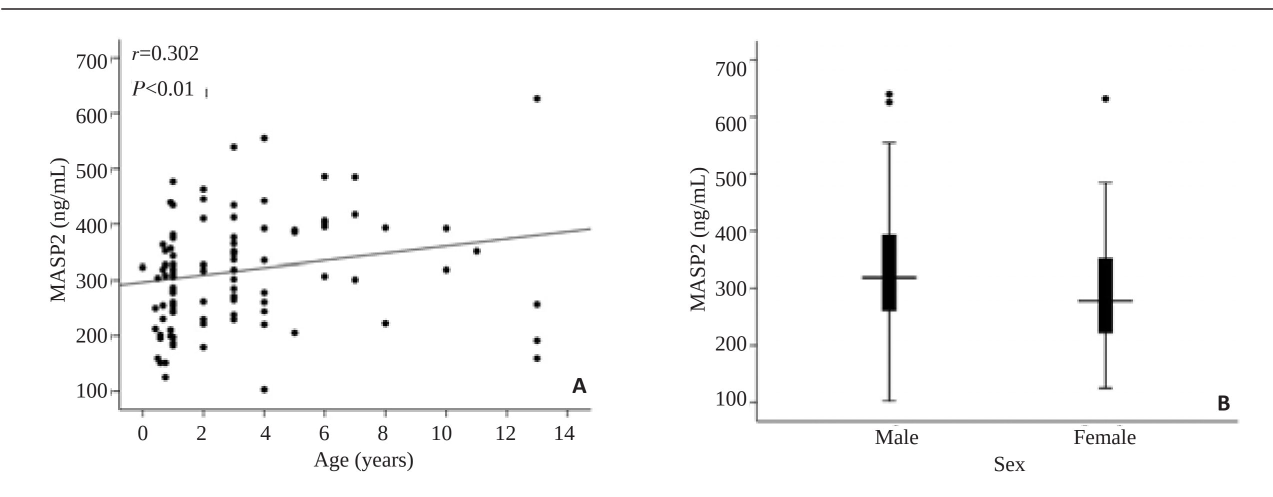
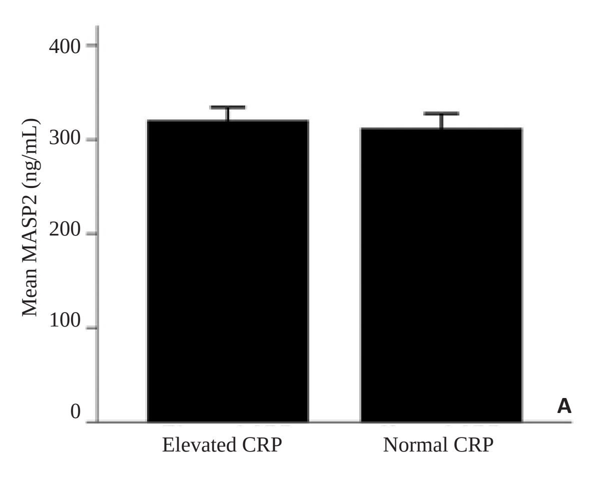
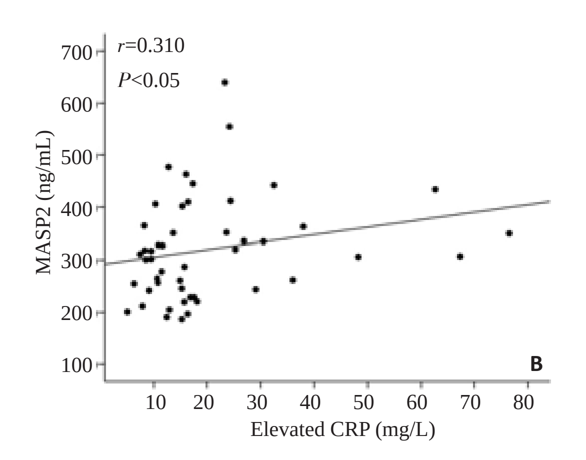


图2 上感儿童血浆MASP2水平与年龄和性别的关系

Fig.2 Relations of plasma MASP2 levels with age (*A*) and gender (*B*) in URTI group.

浓度均升高且均值无明显差异($P>0.05$)。然而,将血浆MASP2浓度与CRP值进行Spearman相关分析,却发现CRP升高组MASP2浓度与CRP值呈正相关($r=0.310$, $P<0.05$),但CRP正常组MASP2浓度与CRP值无明显相关性($r=0.055$,$P>0.05$,图3)。





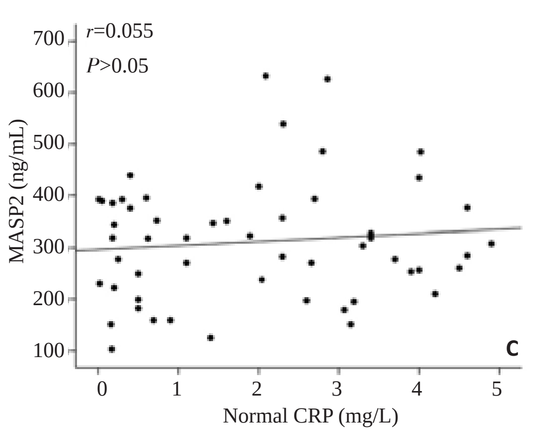
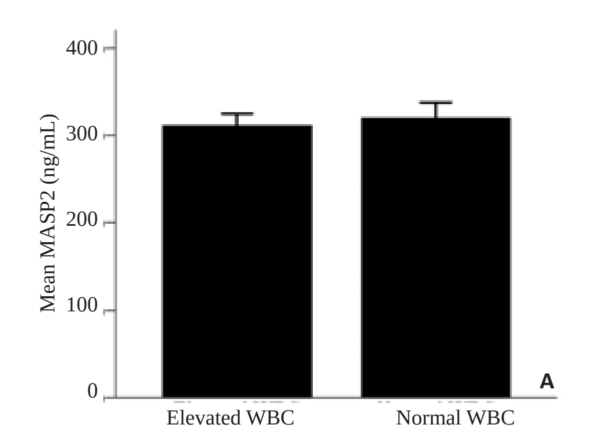


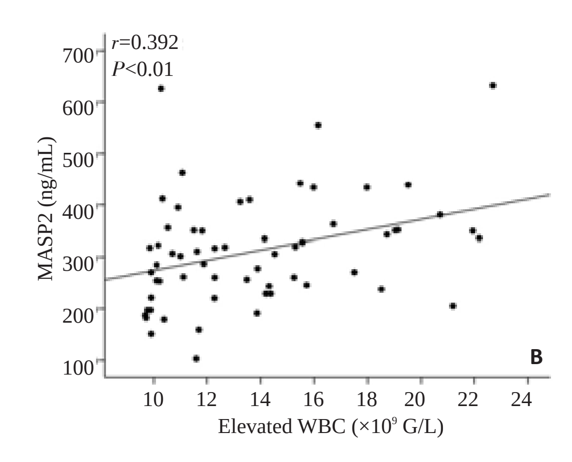
图3 上感儿童血浆MASP2水平与CRP值的关系

Fig.3 Relations of plasma MASP2 level with CRP level in children with URTI. *A*: Comparison of plasma MASP2 levels between the elevated CRP group and the normal CRP group; *B*: Correlation analysis between plasma MASP2 level and CRP in the elevated CRP group; *C*: Correlation analysis between plasma MASP2 level and CRP in the normal CRP group.

2.4 上感儿童中WBC升高组MASP2浓度与WBC值正相关但WBC正常组MASP2浓度与WBC值不相关

上感儿童WBC正常组与WBC升高组血浆MASP2浓度均升高且均值无差别($P>0.05$)。然而,分别将血浆MASP2浓度与WBC值进行Spearman相关分析却发现,WBC升高组MASP2浓度与WBC值呈正相关($r=0.392$,$P<0.01$),但WBC正常组MASP2浓度与WBC值无明显相关性($r=0.075$,$P>0.05$,图4)。





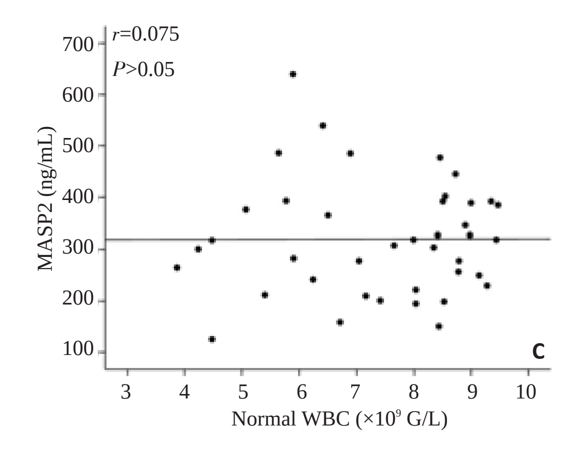


图4 上感儿童血浆MASP2水平与WBC值的关系

Fig.4 Relations between plasma MASP2 level and WBC in children with URTI. *A*: Comparison of plasma MASP2 levels between the elevated WBC group and the normal WBC group; *B*: Correlation analysis between plasma MASP2 level and WBC in the elevated WBC group; *C*: Correlation analysis between plasma MASP2 level and WBC in the normal WBC group.

2.5 感染早期未用药组血浆MASP2浓度高于感染中后期已用药组

感染早期未用药组儿童血浆MASP2平均浓度为336 ng/mL，感染中后期已用药组儿童为277 ng/mL，两者比较有显著差异（t=2.791，P<0.01，图5）。

2.6 *MASP2*、*MBL*、*CRP*基因具有共同的应激元件

应用生物信息学分析*MASP2*、*MBL*、*CRP*基因，结果表明它们具有共同的转录因子HNF-4α结合位点，不同基因中HNF-4α结合位点详见表1。查询转录因子结合谱数据库，获得该转录因子结合的motif图谱（图6）。HNF-4α结合于*MASP2*基因5'上游序列的结合位点，可调控*MASP2*基因的表达，提示MASP2也可能是一种急性期蛋白。

图5 感染早期未用药组与感染中后期用药组血浆MASP2水平比较

Fig.5 Comparison of plasma MASP2 levels between early stage of infection without treatment group and mid-late stage of infection with treatment group. **P<0.01.

3 讨论

在发展中国家，急性呼吸道感染是儿童发病率最高的疾病，占门诊病人20%~40%。上感是鼻炎、咽炎、扁桃体炎、中耳炎等急性炎症的总称，占呼吸道感染疾病的87.5%[5]。不少报道描述了血清MASP2浓度与麻风病[6]、美洲锥虫病[7]、风湿性关节炎[8]等疾病之间的关系。有报道MASP2水平偏高者更易感染丙型肝炎病毒[9]，但亦有研究发现MASP2水平低下的患者在原位肝移植术后更容易感染细菌[10]。目前，尚未见研究血浆MASP2水平与上感关系的报道。

本研究发现，上感儿童血浆MASP2浓度区间为159~640 ng/mL，平均浓度为316 ng/mL，而对照儿童血浆MASP2浓度区间为33~304 ng/mL，平均浓度为130 ng/mL，上感儿童血浆MASP2浓度显著高于对照儿童（P<0.001）。推测其原因可能是，患儿在受到病毒和/或细菌的侵袭时，刺激MASP2合成显著增加，从而

表1 不同基因中转录因子HNF-4结合位点信息
Tab.1 Information of transcription factor HNF-4α binding loci in different genes

	Binding region name	Loci	TF information
MASP2	HNF4A_177	chr1:11107186-11107623	GSE22078HNF4A
MBL2	HNF4A_3336	chr10:54527955-54528366	GSE22078HNF4A
CRP	HNF4A_1840	chr1:159675397-159675805	GSE22078HNF4A

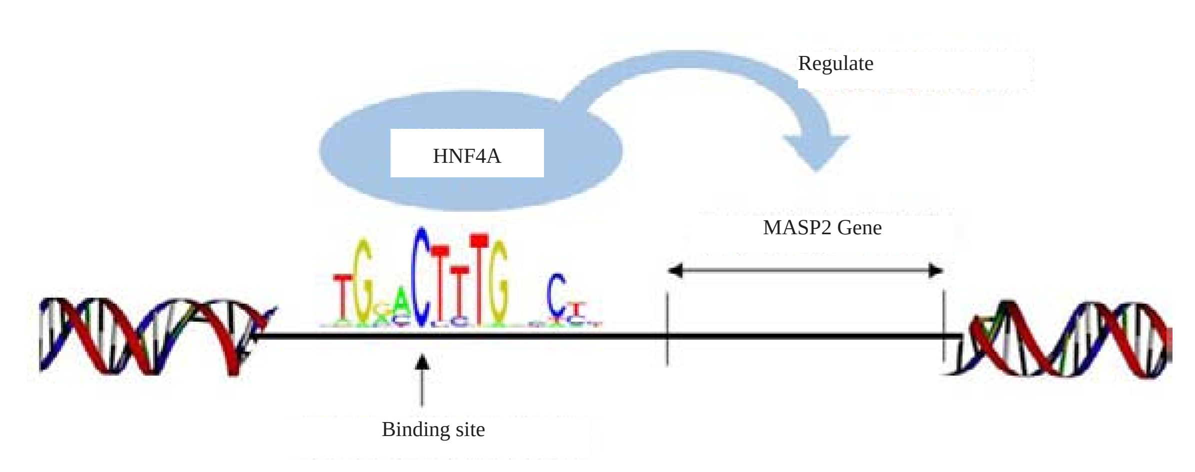


图6 转录因子HNF-4α调控*MASP2*基因表达示意图
Fig.6 Schematic diagram of MASP2 gene regulation by the transcription factor HNF-4α.

激活补体凝集素途径并发挥调理吞噬作用。上感组儿童血浆MASP2水平与年龄显著相关(P<0.01),但男、女2组血浆MASP2浓度无统计学差异,表明MASP2水平的变化与年龄长幼有很大关系,也提示儿童时期MASP2合成分泌的发育不完全,是机体免疫功能低下的一个方面。上感儿童CRP正常组与CRP升高组血浆MASP2浓度均升高且均值无差别,但CRP升高组血浆MASP2水平与CRP值呈正相关(P<0.05),而CRP正常组血浆MASP2浓度与CRP值无相关性。CRP是在肝脏合成的一种急性期蛋白,是炎症及感染疾病的一个早期指标。正常情况下CRP浓度小于5 mg/L,但在应激条件下如感染、炎症、组织损伤等,血浆CRP浓度可快速升高,最高达500倍,且其升高程度与感染或炎症的严重程度呈正相关[11]。上感儿童WBC正常组与WBC升高组血浆MASP2浓度均升高且均值无差别,但WBC升高组MASP2水平与WBC值显著正相关(P<0.01),而WBC正常组MASP2水平与WBC值无显著相关性。白细胞是机体防御系统的重要组成部分,当病原体侵入体内时,机体就会动员白细胞,释放入外周循环。如果外周白细胞数量高于正常值,很可能是机体被感染或有其它炎症。因此,血浆MASP2水平升高也可从另一个角度表明患者感染或炎症的严重程度。我们还发现,感染早期未用药上感儿童血浆MASP2浓度显著高于感染中后期已用者(P<0.01)。感染后,机体免疫系统被激活,释放大量IL-6、TNF-α等细胞因子,可能刺激MASP2分泌,而使用抗病毒药物及抗生素等后,随着病原体被杀灭和炎症缓解,对MASP2合成分泌的刺激作用减弱,此时MASP2水平也就降低了。小儿上感80%为病毒感染,在病毒感染早期CRP值一般小于1 mg/L,未治疗或治疗无效时可能会继发细菌感染,此时CRP值会显著升高。所以约52.9%的患儿CRP值并未出现异常。临床上常联合CRP值与WBC值作为辅助诊断细菌性上感的参考依据[12]。本研究发现,有些患儿MASP2浓度很高如大于600 ng/mL,但CRP值正常,而WBC值却显著升高;另一方面,MASP2浓度高于600 ng/mL的个别患儿,CRP值高于200 mg/L,但WBC计数确正常。WBC值是判断患者有无细菌感染的传统指标,但其受患者年龄、日间变化、应激、药物治疗等因素影响,也与个体差异相关,有的患儿免疫功能低下,机体反应低下,所以WBC值的敏感性有一定局限性。因此在诊断细菌感染时仅作为一个参考指标。病毒感染时,患儿早期WBC值正常或者偏低,而此时病毒感染可能通过促炎细胞因子的介导,刺激MASP2大量分泌。上述资料表明,在上感儿童,不论CRP、WBC值是否正常,MASP2值均升高,提示后者比前二者更全面且敏感。因此,联合应用MASP2、CRP、WBC指标对于辅助诊断上感(尤病毒性)可能是有价值的。

鉴于上述发现,我们假设MASP2为类似CRP和

MBL的急性期蛋白。机体受到应激原(如感染、炎症、组织损伤、烧伤、局部缺血坏死以及恶性肿瘤)刺激后短时间内即可出现血清成分的变化,称为急性期反应(acute-phase response, APR),参与急性期反应的物质一般为蛋白质,所以称急性期蛋白。肝脏中APR是由IL-6、IL-1、TNF-α等细胞因子作用于HNF(hepatic nuclear factors)家族转录因子[13],转录因子激活后,识别相应基因的启动子区域,从基因水平调控APR反应。通过UCSC genome Browser搜索发现,CRP、MBL2和MASP2基因均含1个HNF-4α结合位点。通过DeepBase点chip发现,在CRP的1840位置(http://deepbase.sysu.edu.cn/chipbase/view ChipSeqInfo.php?table=GSE22078HNF4A&database=hg19&id=1840)、MBL的3336位置(http://deepbase.sysu.edu.cn/chipbase/viewChipSeqInfo.php?table=GSE22078HNF4A&database=hg19&id= 3336)和MASP2的177位置(http://deepbase.sysu.edu.cn/chipbas/viewChipSeqInfo.php? table=GSE22078HNF4A& database=hg19&id=177)各有1个HNF-4α结合位点。CRP和MBL都是典型的急性期蛋白,而HNF-4α是肝脏应激反应中重要且特异的转录因子[13]。资料表明,*CRP*、*MBL*、*MASP2*基因具有共同的应激元件且均被HNF-4α识别,MASP2可能是急性期蛋白。

综上,我们推论MSAP2为急性期蛋白,血浆MASP2水平可能作为辅助诊断小儿上感的一个参考指标,也可用于辅助诊断其它有关疾病。至于其是否比CRP、WBC指标更具优势,则需更多的研究加以明确。

参考文献:

[1] Cedzynski M, Szemraj J, Swierzko AS, et al. Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 136(2): 304-11.

[2] Dommett RM, Klein N, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future[J]. Tissue Antigens, 2006, 68(3): 193-209.

[3] Nazari S, Ebrahimi M, Abdollah Gorji F, et al. Association between serum levels of MASP-2 and neutropenic febrile attacks in children with leukemia[J]. Arch Iran Med, 2012, 15(10): 625-8.

[4] 沈晓明, 王卫平. 儿科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 261-3.

[5] Jain N, Lodha R, Kabra SK. Upper respiratory tract infections[J]. Indian J Ped, 2001, 68(12): 1135-8.

[6] Boldt AB, Goeldner I, Stahlke ER, et al. Leprosy association with low MASP-2 levels generated by MASP2 haplotypes and polymorphisms flanking MAp19 Exon 5[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69054.

[7] Boldt AW, Luz PR. Messias-Reason IJT. MASP2 haplotypes are associated with high risk of cardiomyopathy in chronic chagas disease[J]. Clin Immunol, 2011, 140(1): 63-70.

[8] Goeldner I, Skare T, Boldt AB, et al. Association of MASP-2 levels and MASP2 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in patients and their relatives[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90979.

[9] Tulio S, Faucz FR, Werneck RI, et al. MASP2 gene polymorphism is associated with suscepti- bility to hepatitis C virus infection[J]. Hum Immunol, 2011, 72: 912-5.

[10] De Rooij BF, Van Hoek B, Ten Hove WR, et al. Lectin complement pathway gene profile of donor and recipient determine the risk of bacterial infections after orthotopic liver transplantation [J]. Hepatol, 2010, 52(3): 1100-10.

[11] 贾淑荣, 刘卫东. C反应蛋白测定对急性冠脉综合征的诊断意义[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(5): 904.

[12] 杨清梅, 钟建辉. CRP和WBC联合检测在儿童急性呼吸道感染中的应用价值[J]. 中外医疗, 2014, 33(3): 7-8.

[13] Bauza G, Miller G, Kaseje N, et al. Injury-Induced changes in liver specific transcription factors HNF-1 alpha and HNF-4 alpha[J]. J Surg Res, 2012, 175(2): 298-304.

(编辑:吴锦雅)